

10/509529 #2

PCT/JP03/0386

Rec'd PCT/PTO

24 SEP 2004

日 本 国 特 許 庁

27:03.03

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月27日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-089624

[ST.10/C]:

[JP 2002-089624]

REC'D 23 MAY 2003

WIPO

PCT

出 願 人

Applicant(s):

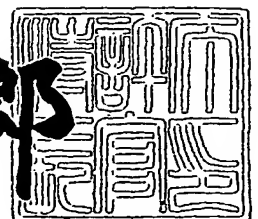
学校法人慶應義塾

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033317

【書類名】 特許願

【整理番号】 000000299

【提出日】 平成14年 3月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 戸田 正博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 岡野 栄之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 河上 裕

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 戸山 芳昭

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 三上 裕嗣

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 坂口 昌徳

【特許出願人】

【識別番号】 899000079

【氏名又は名称】 学校法人 慶應義塾

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】 100102255

【弁理士】

【氏名又は名称】 小澤 誠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100118957

【弁理士】

【氏名又は名称】 岡 晴子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経幹細胞の増殖誘導方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれか一種と接触させることを特徴とする神経幹細胞の増殖誘導方法。

【請求項 2】 神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれか一種と培養培地中で接触させることを特徴とする請求項 1 記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。

【請求項 3】 神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで神経幹細胞と樹状細胞及び／又は血球系細胞とを共培養することを特徴とする請求項 2 記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。

【請求項 4】 神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで樹状細胞の培養上清及び／又は血球系細胞の培養上清中で神経幹細胞を培養することを特徴とする請求項 1 記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。

【請求項 5】 成長因子を含む培養培地が、少なくとも EGF 及び／又は FGF を含む培養培地であることを特徴とする請求項 2～4 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。

【請求項 6】 樹状細胞が、細胞表面に CD11c の表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットであることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。

【請求項 7】 血球系細胞が、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法。

【請求項 8】 神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の

培養上清、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれか一種を備えていることを特徴とする神経幹細胞の増殖誘導セット。

【請求項9】 さらに、成長因子を含む培養培地を含むことを特徴とする請求項8記載の神経幹細胞の増殖誘導セット。

【請求項10】 成長因子を含む培養培地が、少なくともEGF及び／又はFGFを含む培養培地であることを特徴とする請求項9記載の神経幹細胞の増殖誘導セット。

【請求項11】 樹状細胞が、細胞表面にCD11cの表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットであることを特徴とする請求項9記載の神経幹細胞の増殖誘導セット。

【請求項12】 血球系細胞が、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、多分化能を有する未分化な神経系の細胞である神経幹細胞の増殖誘導方法や神経幹細胞を増殖誘導するのに用いられる神経幹細胞の増殖誘導セットに関する。

【0002】

【従来の技術】

脊髄損傷の多くは外傷性で、その原因は交通事故、スポーツ、労災などであるが、非外傷性のものとしては、炎症、出血、腫瘍、脊椎変形などが原因となっている。病態は、脊髄実質に出血、浮腫を基板とした脊髄の挫滅と圧迫病変であり、損傷部位に対応する神経障害が生じる。主な臨床症状として、障害レベル以下に、不全あるいは完全運動及び知覚麻痺が出現し、また、頸髄損傷では、特有な合併症として呼吸麻痺と過高熱（または過低熱）がみられる。上記神経障害の改善、特に運動障害の改善は、寝たきり老人増加の防止やQOL（Quality of Life

)の向上に直結しており、近年の平均寿命の延長とともにその重要性が高まりつつある。

【0003】

上記脊髄損傷の治療法として行なわれているのは、物理的な圧迫や傷害を除去するための外科的手術と、受傷急性期の脊髄浮腫に対してのステロイド療法である (N. Engl. J. Med. 322, 1405-1411, 1990、J. Neurosurg 93, 1-7, 2000)。ステロイド剤の中ではメチルプレドニゾロンの大量投与が脊髄損傷に伴う神経症状の改善に有効であると報告されている (J. Spinal Disord. 5(1), 125-131, 1992) が、ステロイド剤の大量投与は全身的副作用も強く発現し、コントロールが難しいことに加えて、感染症を伴う脊髄損傷では感染防御機能低下をきたすという問題点がある。また、さらに現在ステロイド大量投与療法の有効性についてさえ議論されている。以上の様に現在まで、脊髄損傷に対する有効な治療薬はなく、新しい治療薬の開発が切望されている。

【0004】

上記以外の脊髄損傷の治療方法として報告されているものは、インビトロで炎症関連サイトカインにより前処理された神経膠星状細胞を中枢神経系 (CNS) 中の損傷部位に、治療上有効な量を移植する方法 (特表2000-503983号公報) や、同種の単核貪食細胞 (単球、マクロファージ等) を、損傷または疾患部位に、あるいはその近傍の中枢神経系 (CNS) に投与することにより、哺乳動物CNSにおける神経軸索再生を促進する方法 (J. Mol. Med. 77, 713-717, 1999、J. Neurosci. 19(5), 1708-16, 1999、Neurosurgery 44(5), 1041-5, 1999、Trends. Neurosci 22(7), 295-9, 1999) (特表平11-13370号公報) などである。また、明確な機序は不明であるが、spinal cord homogenateによるvaccinationや髄鞘蛋白質であるmyelin basic proteinに特異的なT細胞を投与することにより、脊髄損傷後の運動維持の回復を促進させたという報告もなされている (Neuron 24, 639-647, 1999、Lancet 354, 286-287, 2000)。

【0005】

近年欧米では、中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンが変性・脱落するパーキンソン病に対して、胎児の脳細胞移植による臨床試験が行われた (Piccini P.

, et al., Nat Neurosci., 2, 1999、Freed C.R., et al., N. Engl. J. Med., 344, 2001)。本治療法により、60歳未満の患者の運動能力が改善されることが明らかになったが、この移植治療を一人のパーキンソン病患者に対して行うためには、5～10体もの中絶胎児が必要とされる。

【0006】

一方、1992年Weissらのグループによりニューロスフェア (neurosphere) 法という神経幹細胞の選択的培養法が開発されたことにより、神経幹細胞の研究は大きな展開を迎えた (Reynolds B.A, et al. J. Neurosci., 12, 1992)。神経幹細胞を含む細胞群を分裂促進因子を含む無血清培養液で培養するもので、神経幹細胞のみが増殖して細胞塊ニューロスフェア (neurosphere) をなして浮遊する。さらにこの生起したニューロスフェアを一つ一つの細胞に分離してまた上記の無血清培養液で培養すると同様にニューロスフェアが形成される。またこのニューロスフェアを上記の無血清培養液から分裂促進因子を除いて培養すると分化が誘導され、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3種の細胞ができることが知られている。

【0007】

他方、樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) は造血幹細胞由来の樹枝状形態をとる細胞集団で、生体内に広く分布している。未成熟樹状細胞は、それぞれの組織に侵入したウイルスや細菌をはじめとする異物を認識して取り込み、リンパ系器官T細胞領域への移動の過程で消化分解してペプチドを生成し、MHC分子に結合させて細胞表面に提示することにより抗原特異的なT細胞を活性化して免疫応答を誘導する抗原提示細胞としての役割を担っている (Ann. Rev. Immunol. 9, 271-296, 1991、J. Exp. Med. 185, 2133-2141, 1997)。

【0008】

樹状細胞は、その分布が広範であるものの各組織における密度が高くなかったために多数の細胞の調製は困難であったが、未熟な前駆細胞の培養に分化増殖因子を添加することによりインビトロで多数の細胞が容易に調製可能になったことを受け、免疫賦活化剤として樹状細胞を利用することが検討され始めている (J. Exp. Med. 183, 7-11, 1996)。とりわけ、微弱な腫瘍免疫応答に対して樹状細胞

胞に抗原をパルスすることにより特異的に免疫応答を増強しようとするものである。動物実験では、腫瘍由来のタンパク質や抗原ペプチドを提示した樹状細胞により特異的CD8⁺細胞障害性T細胞が誘導されることが示されており、ヒトでも同様に腫瘍由来のタンパク質や抗原ペプチドを樹状細胞とともに生体に戻すことにより腫瘍の減少あるいは消失が報告されている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

神経幹細胞は、分裂・増殖することができる自己複製能と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する3種類の細胞に分化する能力、すなわち多分化能を有する未分化な神経系の細胞である（Temple S., Nature, 414, 2001）。近年極めて再生能力が低い成人脳においても神経幹細胞が存在することが明らかになり、さらにヒト神経幹細胞の分離、調製が可能になったことから、現在の再生医療研究において大変注目されている存在となっている。

【0010】

最近、試験管内で増やした神経幹細胞をドーパミン作動性ニューロンへと分化誘導する方法が開発された。この方法により誘導された細胞をドナー細胞として移植することが可能になれば、多くの中絶胎児を必要とする現行の方法よりはるかに優れたパーキンソン病の治療法となることが期待される、またこのように今後、幹細胞生物学を駆使し、大量に調製された細胞を移植する治療が、さまざまな神経疾患に対して行われていくと思われる。本発明の課題は、このような移植治療に最も重要である神経幹細胞をインビトロ等で効率良く増殖誘導する方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

成体の脊髄損傷では、内在性神経幹細胞が脊髄内に存在しながらも、ニューロン新生は抑制されており、アストロサイトの増生のみが起きるものと考えられている。単に神経幹細胞を損傷部位に導入したとしても、ニューロンを作らずにグリアだけを作ってしまう、病態の改善にはつながらないことが予想される。した

がって、神経幹細胞の移植に加えて、ニューロンを作るための微少環境の整備が不可欠と考えられる。一方、生体防御機構の一つとして、T細胞を中心とする抗原特異的な免疫反応が存在するが、血液脳関門の存在、MHC抗原の極めて低い発現、リンパ組織の欠除などの理由から、中枢神経系は免疫系から隔絶された特殊な環境にある。そこで本発明者らは、免疫系が病変組織を排除して修復するという考えに基づき、損傷神経組織への免疫系の導入を試みた。具体的には、免疫系を調節するために最も重要な細胞である樹状細胞、また樹状細胞の誘導・増殖に重要なサイトカインである顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を損傷神経組織に投与することにより、内在性の神経幹細胞が増殖誘導されることや、また、樹状細胞との共培養によるインビトロでの神経幹細胞の増殖誘導が生起することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち本発明は、神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれか一種と接触させることを特徴とする神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項1）や、神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の少なくともいずれか一種と培養培地中で接触させることを特徴とする請求項1記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項2）や、神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで神経幹細胞と樹状細胞及び／又は血球系細胞とを共培養することを特徴とする請求項2記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項3）や、神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで樹状細胞の培養上清及び／又は血球系細胞の培養上清中で神経幹細胞を培養することを特徴とする請求項1記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項4）や、成長因子を含む培養培地が、少なくともEGF及び／又はFGFを含む培養培地であることを特徴とする請求項2～4のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項5）や、樹状細胞が、細胞表面にCD11cの表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットであることを特徴とする

請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項 6）や、血球系細胞が、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導方法（請求項 7）に関する。

【 0 0 1 3 】

また本発明は、神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM－CSF）の少なくともいずれか一種を備えていることを特徴とする神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 8）や、さらに、成長因子を含む培養培地を含むことを特徴とする請求項 8 記載の神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 9）や、成長因子を含む培養培地が、少なくとも EGF 及び／又は FGF を含む培養培地であることを特徴とする請求項 9 記載の神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 10）や、樹状細胞が、細胞表面に CD11c の表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットであることを特徴とする請求項 9 記載の神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 11）や、血球系細胞が、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか記載の神経幹細胞の増殖誘導セット（請求項 12）に関する。

【 0 0 1 4 】

【発明の実施の形態】

本発明の神経幹細胞の増殖誘導方法としては、神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM－CSF）の少なくともいずれかと接触させる方法であれば、インビトロ、インビボ、エクスピボを問わず、特に制限されるものではないが、大量に調製された神経幹細胞を必要とする移植治療を考慮すると、神経幹細胞を樹状細胞、血球系細胞、GM－CSF から選ばれる少なくともいずれか一種と、DMEM/F12 培地等の培養培地中で接触させ、神経幹細胞の増殖を誘導する方法が好ましい。具体的には、分裂・増殖することができる自己複製能と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する

3種類の細胞に分化する多分化能を有する神経幹細胞を含む哺乳類神経組織、例えば胎仔の被殻一線条体部位等を分離・採取し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、必要に応じて神経幹細胞の純度を高める処理を施した後、かかる神経幹細胞と樹状細胞及び／又は血球系細胞とを培養培地中で共培養することにより接触させる神経幹細胞を増殖誘導する方法を挙げることができる。また、上記樹状細胞及び／又は血球系細胞との共培養の有無にかかわらず、GM-CSFの存在下で神経幹細胞を培養することにより接触させる、神経幹細胞を増殖誘導する方法も挙げることができる。さらに、上記と同様に、神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで樹状細胞の培養上清及び／又は血球系細胞の培養上清中で神経幹細胞を培養することにより接触させる、神経幹細胞を増殖誘導する方法も好適に例示することができる。

【0015】

上記成長因子としては、上皮増殖因子（EGF）、酸性の繊維芽細胞成長因子（aFGF又はFGF-1）、塩基性の繊維芽細胞成長因子（bFGF又はFGF-2）、トランスフォーミング成長因子 α （TGF α ）、アンフィレグリン、ベタセルリン（BTC）、エピレグリン（ER）、ヘパリン結合EGF様増殖因子（HB-EGF）、神経線維腫由来増殖因子（SDGF）等を例示することができ、中でもEGFやFGFを好適に例示することができる。また、上記成長因子を含む培養培地には、EGFやFGF等の成長因子の他に、トランスフェリン、インシュリン（Insulin）、レチノイン酸、アクチビン、インターロイキン等のこの種細胞の培養に通常使用される成分を添加しておくこともできる。

【0016】

上記樹状細胞としては、細胞表面にCD11cの表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、又は該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットを好適に例示することができ、かかる樹状細胞サブセットには、インビボでの神経再生効果やマイクログリアの増殖、食作用の増強を誘導する神経栄養因子NT-3を分泌する樹状細胞サブセットや、NT-3に加えて、脊髄運動知覚両神経に対し変性・細胞死保護の効果が示すCNTF（神経栄養因子）、マイクログリア

アやマクロファージ由来の細胞障害性物質の放出の抑制作用を有する $TGF-\beta$ 1、各種ニューロン（コリン・カテコールアミン・ドーパミン作動性）に対する保護効果を誘導する $IL-6$ を発現する未成熟樹状細胞サブセットや、 $NT-3$ に加えて、 $CNTF$ 、 $TGF-\beta$ 1、 $IL-6$ 、神経保護効果の認められている EGF を発現する成熟樹状細胞サブセットが含まれる。また、上記成熟樹状細胞サブセットとして、 LPS 、 $IL-1$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $CD40L$ 等の未成熟樹状細胞を成熟させるための刺激剤の存在下で、未成熟樹状細胞サブセットをインビトロで培養することにより得られる成熟樹状細胞サブセットを用いることもできる。

【0017】

細胞表面に $CD11c$ の表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセットは、例えば、末梢血等に対し密度遠心分離処理等の前処理を行った後、樹状細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いて $FACS$ でソートする方法や、樹状細胞表面抗原に対する磁気ビーズ結合モノクローナル抗体を用いる分離方法等により樹状細胞サブセットを分離し、それらの中から $CD11c$ 陽性の樹状細胞サブセットを選択することにより得ることができる。そして、神経幹細胞と接触させる樹状細胞は、該神経幹細胞と同種のものが好ましく、また、神経幹細胞と接触させる樹状細胞数は、細胞数比において神経幹細胞の 10^3 以上が、神経幹細胞の顕著な増殖誘導の点で好ましい。

【0018】

上記血球系細胞としては、脾細胞、 T 細胞、単球、好中球、好酸球、好塩基球等を具体的に例示することができるが、 T 細胞、特に $CD8$ 陽性 T 細胞や脾細胞を好適に例示することができる。

【0019】

次に、本発明の神経幹細胞の増殖誘導セットとしては、神経幹細胞を、樹状細胞、血球系細胞若しくはこれら細胞の培養上清、又は $GM-CSF$ の少なくともいずれか一種を備えている細胞増殖誘導セットであれば特に制限されるものではないが、さらに、上記 EGF 、 FGF 等の成長因子などの各種成分を含む培養培地を備えたものが好ましい。また、上記樹状細胞としては、細胞表面に $CD11$

c の表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット、あるいは該未成熟樹状細胞に由来する成熟樹状細胞サブセットが好ましく、血球系細胞としては、脾細胞、T細胞、単球、好中球、好酸球又は好塩基球が好ましい。

【0020】

本発明の神経幹細胞の増殖誘導方法をインビトロ又はエクスピボで実施し、得られた神経幹細胞を用いたり、あるいは本発明の神経幹細胞の増殖誘導方法をインビボで実施したりすると、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病等の変性性疾患や、中枢神経系に対する外傷性及び神経毒性損傷や、虚血神経系への血流又は酸素供給阻害に起因する疾病等の治療が可能になる。従って、本発明の神経幹細胞の増殖誘導セットは、上記神経損傷又は神経機能不全疾患治療薬となる可能性が高い。

【0021】

上記神経幹細胞の増殖誘導セットを神経損傷又は神経機能不全疾患治療薬として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またかかる治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口に局所に投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

【0022】

【実施例】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1（樹状細胞の分離）

生後6週齢のBALB/cあるいはC57BL/6雌成熟マウス脾臓より、免疫磁気ビーズ法にてCD11c陽性のサブセットを分離することにより未成熟樹状細胞を得た。具体的には、まず脾臓を100U/mlコラーゲナーゼ（Worthington Biochemical Corporation社製）にてホモジェネートした後、分離しにく

い被膜部分をさらに400 U/ml コラーゲナーゼにて37℃、5%CO₂下に20分間インキュベートして、細胞を分離した。得られた細胞を35%BSA溶液中に浮遊させて、遠心管中でさらにRPMI 1640+10%胎仔血清を重層させた後、4℃、3000 rpm、30分間遠心し、35%BSA溶液とRPMI 1640+10%胎仔血清溶液との境界層の細胞を回収した。次に得られた細胞に対して、CD11c 抗原に対する磁気ビーズ結合モノクローナル抗体(2×10⁸ビーズ、Miltenyi Biotec 社製)を4℃にて、15分間反応させ、ビーズ結合細胞を磁気により分離することにより、未成熟樹状細胞サブセットが濃縮された画分を得た。

【0023】

実施例2 (樹状細胞移植による内在性神経幹細胞/前駆細胞の増殖誘導)

生後6週齢のBALB/c雌マウスを用い、エーテル麻酔下に第8胸椎椎弓切除を行い、尖刀にて脊髄を左半切した脊髄損傷モデルマウスを作製した。損傷後直ちにRPMI 1640培地のみ、又は免疫磁気ビーズ法にてCD11c(+)のサブセットをソートすることによって得られた樹状細胞[1×10⁵個/マウス]を脊髄損傷部位に移植した。

【0024】

樹状細胞移植による内在性神経幹細胞/前駆細胞の反応性を検討するため、それらを認識するMusashi-1抗体を用いて、免疫組織染色を行い、陽性細胞数の経時的な変化を調べた。まず、損傷後2、4、7日の樹状細胞移植マウスについて、2%パラフォルムアルデヒドで経心臓的灌流固定を行い、凍結切片を作製した(各群n=3)。次に、一次抗体として抗マウスMusashi-1抗体を利用した免疫組織染色を行った。Musashi-1は1994年にOkanoらにより同定された分子量約38 kDaのRNA結合タンパクであり(Neuron, 1994)、マウスのMusashi-1に対するモノクローナル抗体を用いた解析では神経幹細胞/前駆細胞に強く発現することが報告されている(Dev. Biol. 1996、J. Neurosci. 1997、Dev. Neurosci. 2000)。計測領域に関しては、細胞を移植する際に用いたgel foam(変性コラーゲン)の最も遠位部、及びそこから1 mm離れた地点それぞれで、背側から腹側に至る部分として、損傷辺縁部、遠位部(頭側・尾側)の2つに分

類した（図 1；参考写真 1 参照）。

【 0 0 2 5 】

損傷辺縁部から頭側にかけての代表的切片の染色像を図 2 に示す（参考写真 2 参照）。両群ともに、損傷後 2 日では差はみられないが、損傷後 4 日以降では、樹状細胞移植群において、辺縁部、遠位部ともにMusashi-1陽性細胞が多く認められたものの、コントロール群ではそのような変化は乏しかった。

【 0 0 2 6 】

次にMusashi-1陽性細胞を画像解析装置（Flovel社製）を用いて定量的に解析した。図 3 にMusashi-1陽性細胞数の領域別の経時的変化を示す。損傷後 4 日以降で損傷辺縁部や遠位部ともに、コントロールと比較して樹状細胞移植により有意なMusashi-1陽性細胞数の増加を認めた。特に損傷辺縁部では、損傷後 2 日から 4 日の間に樹状細胞移植群でMusashi-1陽性細胞の著しい増加が認められた。

以上のことより、損傷部位への樹状細胞移植により、内在性神経幹細胞／前駆細胞の増殖を誘導することが明らかになった。

【 0 0 2 7 】

実施例 3（GM-CSF 投与による内在性神経幹細胞／前駆細胞の増殖誘導）

樹状細胞の誘導・増殖に重要なサイトカインである GM-CSF を投与することによる中枢神経系内の神経幹細胞／前駆細胞に対する反応性を解析するため、それらを認識するMusashi-1抗体を用いて、免疫組織染色を行い、陽性細胞数の経時的な変化を調べた。生後 6 週齢のBALB/c 雌マウスを用いて、脊髄損傷モデルマウスを作製し、損傷直後に、生理食塩水のみ又は GM-CSF（250 pg/マウス；Genzyme社製）を 5 μ l 脊髄損傷部位に投与した（各群 n = 3）。損傷後 2、4、7 日目に 2% パラフォルムアルデヒドで経心臓的管灌流固定を行い、凍結切片を作製した。次に、一次抗体として抗Musashi-1抗体を利用した免疫組織染色を行った。計測領域に関しては、細胞を移植する際に用いた gel foam の最も遠位部から背側および腹側 0.5 mm 離れた領域を画像解析装置（Flovel社製）を用いて定量的に解析した（図 4）。図 5 にMusashi-1陽性細胞数の経時的変化を示す。GM-CSF 投与群では損傷後 2 日目からコントロールと比較して多数のMusashi-1陽性細胞を認め、7 日目において有意な細胞数の増

加を認めた。以上のことから、損傷部位へのGM-CSF投与により、神経組織内における内在性神経幹細胞／前駆細胞が増殖誘導されることが明らかになった。

【0028】

実施例4（樹状細胞との共培養によるインビトロでの神経幹細胞の増殖誘導）

損傷部位への樹状細胞移植により、内在性神経幹細胞／前駆細胞の増殖を誘導することが明らかになったが、培養下でも樹状細胞が神経幹細胞を増殖させることが可能であるかを解析した。神経幹細胞の増殖誘導は、神経幹細胞の分離培養を2段階で行った。まず第一段階はC57BL/6胎仔（妊娠14日目）の被殻一線条体部位を採取し、 1×10^5 cells/mlの細胞密度で、DMEM/F12培地にEGF（peprotech社製）20 ng/ml、FGF-2（R&D社製）20 ng/ml、トランスフェリン（Sigma社製）100 μ g/ml、インシュリン（Sigma社製）25 μ g/ml、Progesterone（Sigma社製）20 nM、Sodium selenate（Sigma社製）30 nM、Putrescine（Sigma社製）60 μ Mを添加した培養液で5～7日間培養することで、選択的に神経幹細胞を培養した。

【0029】

さらに得られた神経幹細胞の純度を高めるため、セルソーターを用いてPI染色陰性でかつ直径10 μ m以上の細胞を分離した後、100 cells/wellになるようにプレーティングして、樹状細胞との共培養を開始した。セルソーターはベクトンディッキンソン社製FACS Vantage SEを、解析にはClone cyte plusを用いた。神経幹細胞との共培養に用いる樹状細胞は、C57BL/6雌成熟マウス脾臓よりCD11c陽性のサブセットを分離して $1 \times 10^3 \sim 10^5$ cells/mlの細胞密度になるように前記培養液中に調整し、96well低接着培養プレートに100 μ lずつ加えた。コントロールとして、細胞を加えない群（基本的なニューロスフェアを培養する条件）と、樹状細胞の分泌する最も重要な神経栄養因子であるNT-3（1～10 ng/ml）を添加する群を加え、神経幹細胞の培養を行った。

【0030】

増殖した神経幹細胞は、直径50 μ m以上のニューロスフェア（neurosphere

）と呼ばれる細胞凝集塊を形成するため、共培養開始後8日後に、それぞれの条件におけるニューロスフェアの数（図6）及びその体積（図7）を測定・検討したところ、一般的なニューロスフェアを培養する条件と比較して、樹状細胞（DC）と共培養することにより、特に 1×10^5 cells/mlの条件で、顕著に神経幹細胞を増殖させることが明らかになった。

【0031】

実施例5（樹状細胞の培養上清を用いたインビトロでの神経幹細胞の増殖誘導）

さらに樹状細胞の分泌する物質が神経幹細胞の増殖誘導に働くかどうかの検討を行った。本実験では、樹状細胞のみならず、血球系細胞である脾細胞、T細胞の培養上清を用いてニューロスフェアの数及び体積の解析を行った。実施例4と同様の方法で神経幹細胞の分離を行った。すなわち、C57BL/6胎仔（妊娠14日目）の被殻・線条体部位を採取し、 1×10^5 cells/mlの細胞密度で、DMEM/F12培地にEGF（peprotech社製）20 ng/ml、FGF-2（R&D社製）20 ng/ml、トランスフェリン（Sigma社製）100 µg/ml、インシュリン（Sigma社製）25 µg/ml、Progesterone（Sigma社製）20 nM、Sodium selenate（Sigma社製）30 nM、Putrescine（Sigma社製）60 µMを添加した培養液で、5～7日間培養することで、選択的に神経幹細胞を培養した。さらに得られた神経幹細胞の純度を高めるため、セルソーターを用いて、PI染色陰性でかつ直径10 µm以上の細胞を分離した後、100 cells/mlになるようにプレーティングした。

【0032】

C57BL/6雌成熟マウス脾臓より、脾細胞を調製し、CD11c陽性のサブセットを樹状細胞として、CD8陽性のサブセットをCD8T細胞として分離し、前記培養液中で、24時間培養後、その培養上清を回収した。コントロールとして、細胞を加えない群（基本的なニューロスフェアを培養する条件）を加え、神経幹細胞の培養を行った。増殖した神経幹細胞は、直径50 µm以上のニューロスフェア（neurosphere）と呼ばれる細胞凝集塊を形成するため、共培養開始8日後に、それぞれの条件におけるニューロスフェアの数（図8）及びその体積（図9）を測定・検討したところ、一般的なニューロスフェアを培養する条件

と比較して、樹状細胞（DC）のみならず、脾細胞（SPC）、CD8陽性T細胞（CD8-T）の培養上清により、顕著に神経幹細胞を増殖させることが明らかになった。

【0033】

【発明の効果】

本発明によると、神経損傷又は神経機能不全疾患の移植治療等に最も重要である神経幹細胞をインビトロ、インビボで効率良く増殖誘導することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

樹状細胞移植後のMusashi-1陽性細胞数の計測のための領域設定を示す図である。

【図2】

樹状細胞（DC）、RPMI 1640（RPMI）移植群それぞれにおける、抗Musashi-1抗体を用いた免疫染色の結果、特に損傷辺縁部から頭側にかけての経時的な代表的切片を示す図である。

【図3】

樹状細胞、RPMI 1640移植群それぞれにおける、Musashi-1陽性細胞数の領域別の経時的变化を示す図である。

【図4】

GM-CSF投与後のMusashi-1陽性細胞数の計測のための領域設定を示す図である。

【図5】

GM-CSF投与後のMusashi-1陽性細胞数の経時的变化を示す図である。

【図6】

樹状細胞との共培養により形成されたニューロスフェアの数を示す図である。それぞれ解析した4wellの平均値を示した。

【図7】

樹状細胞との共培養により形成されたニューロスフェアの体積を示す図である。それぞれ解析した4wellの平均値を示した。

【図 8】

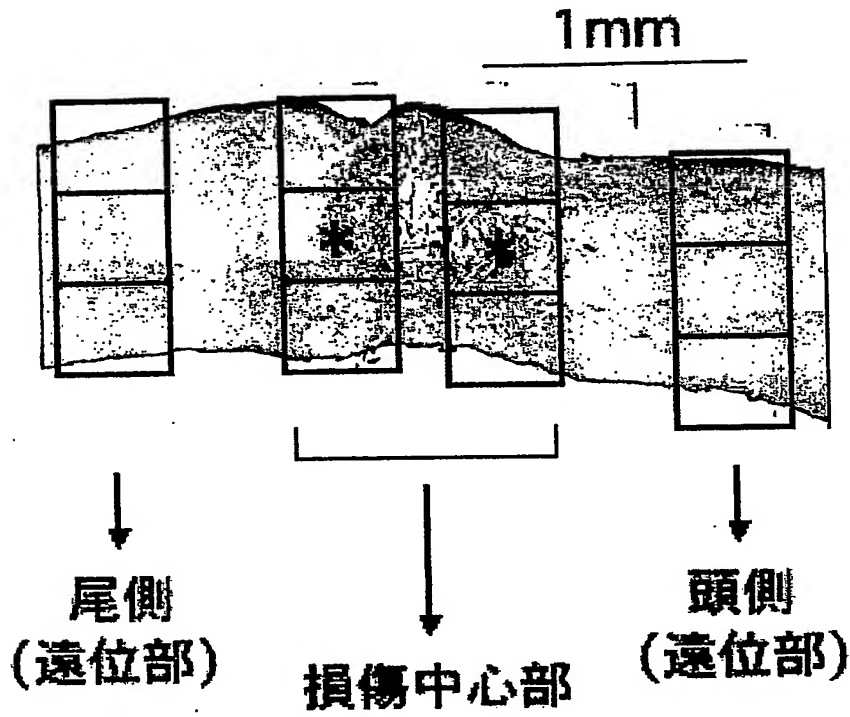
樹状細胞、脾細胞、T細胞の培養上清を用いた培養により形成されたニューロスフェアの数を示す図である。解析した 4 well の平均値を示した。

【図 9】

樹状細胞、脾細胞、T細胞の培養上清を用いた培養により形成されたニューロスフェアの体積を示す図である。形成されたニューロスフェアの平均値を示した。

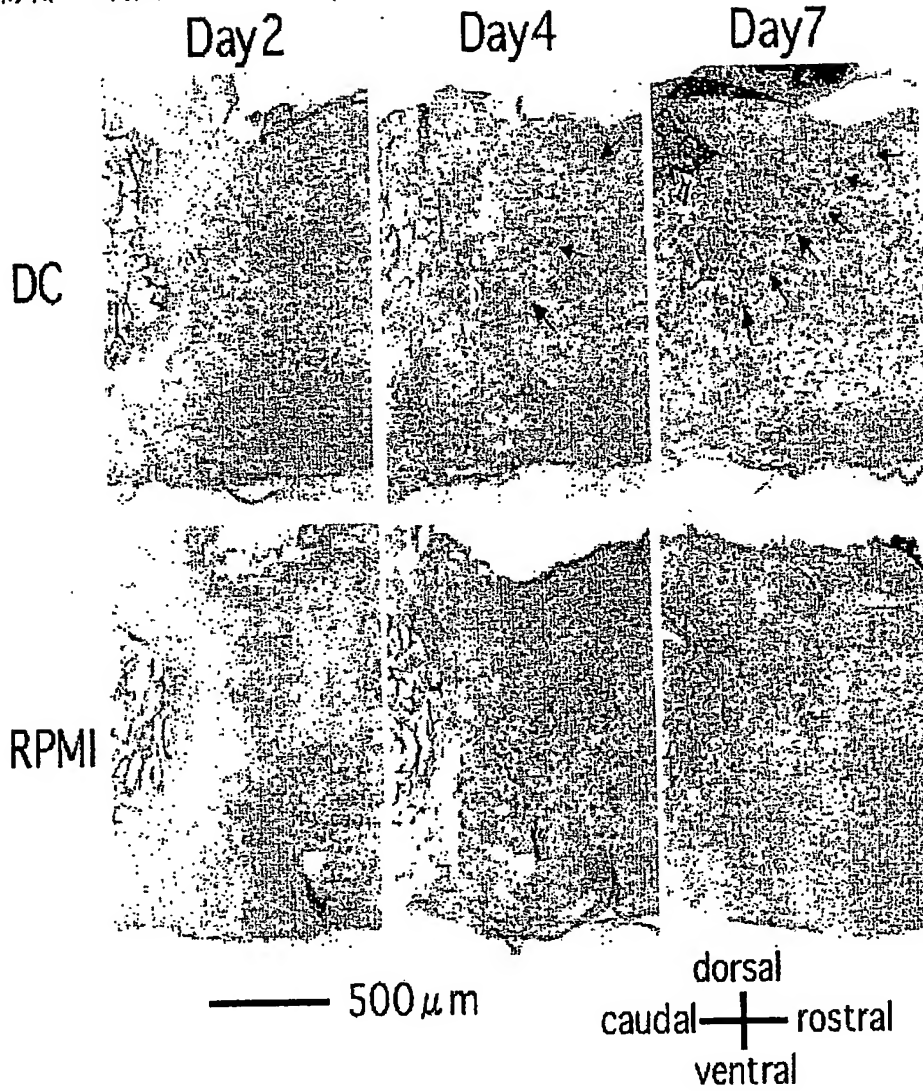
【書類名】 図面

【図1】

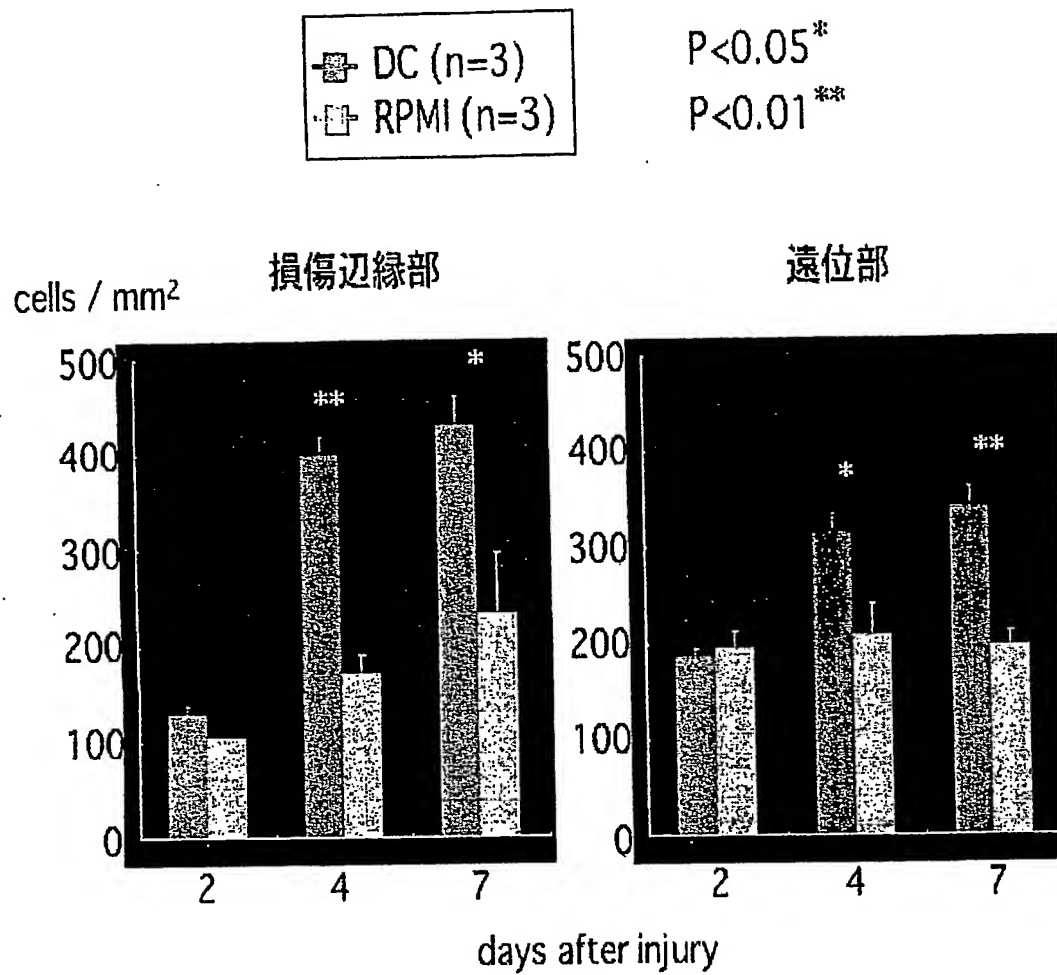


【図 2】

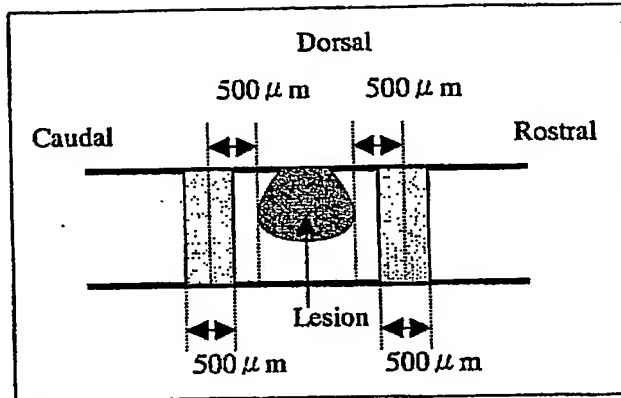
損傷辺縁部～頭側



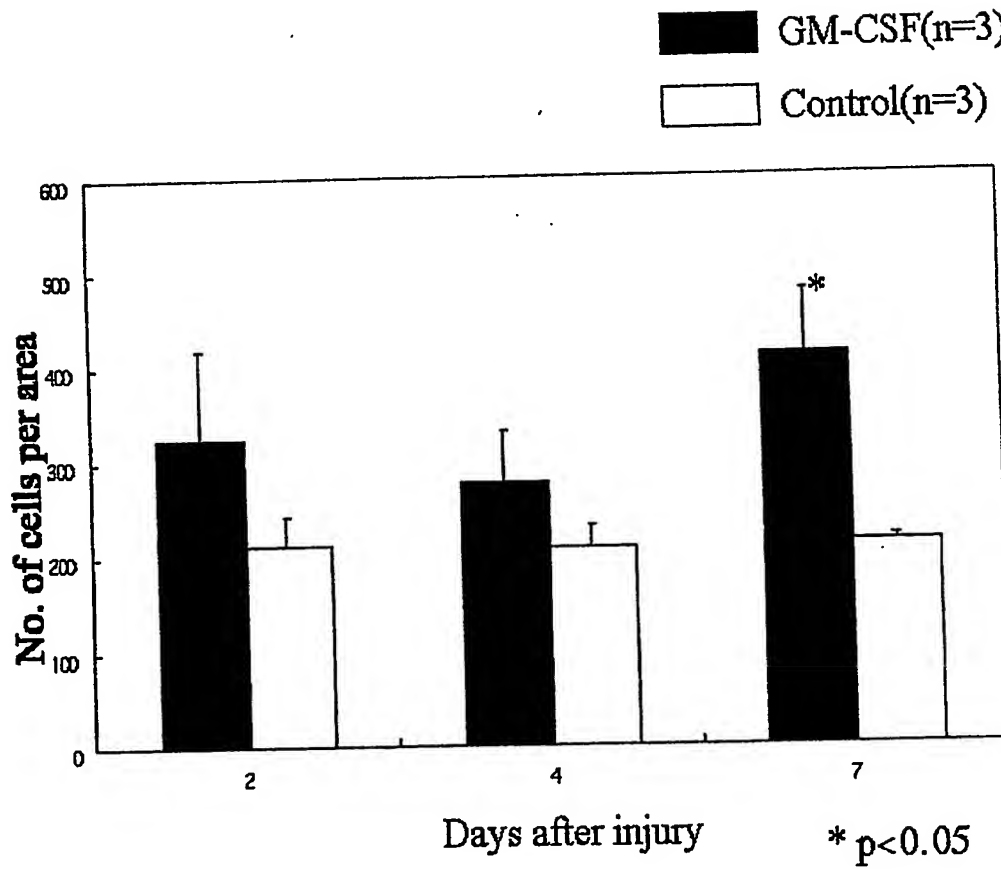
【図 3】



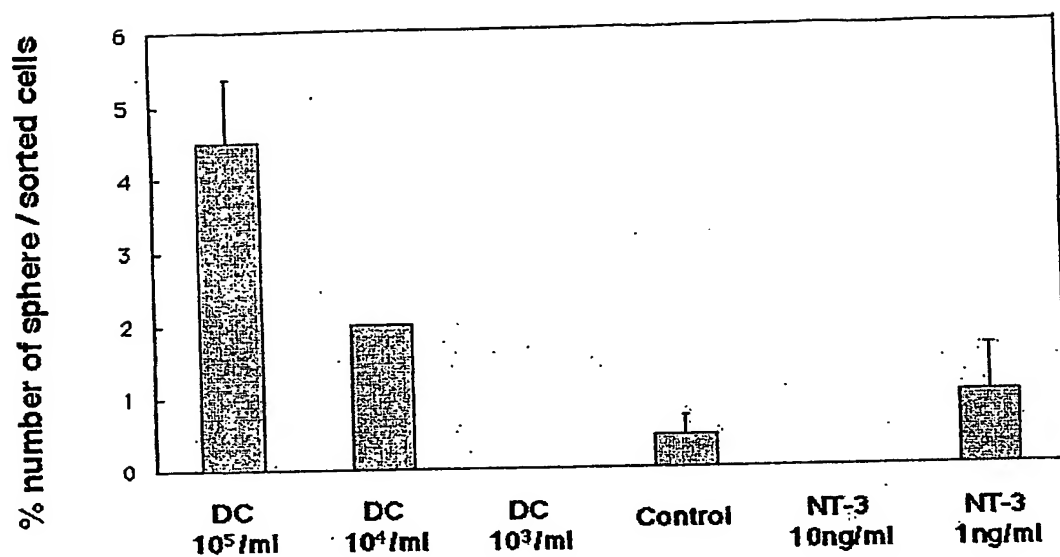
【図 4】



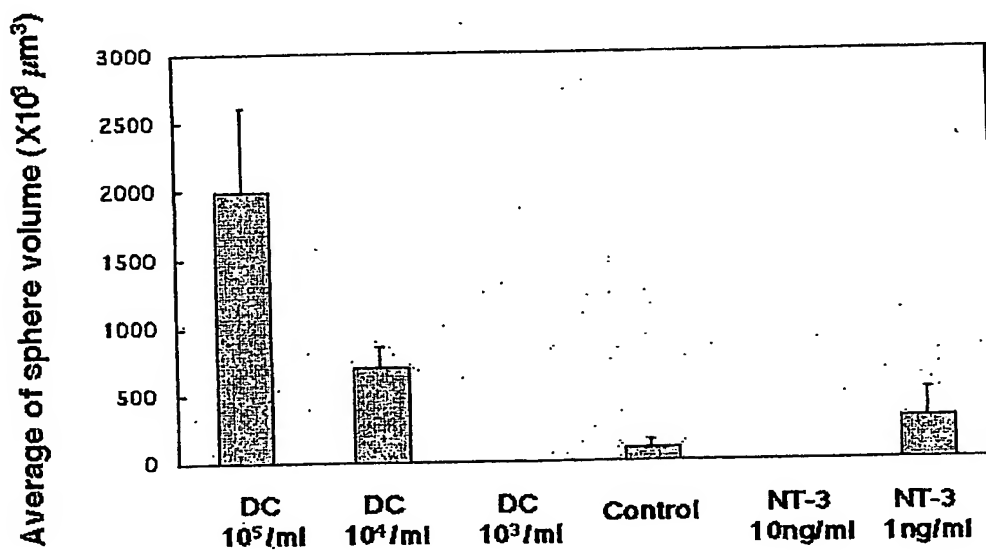
【図 5】



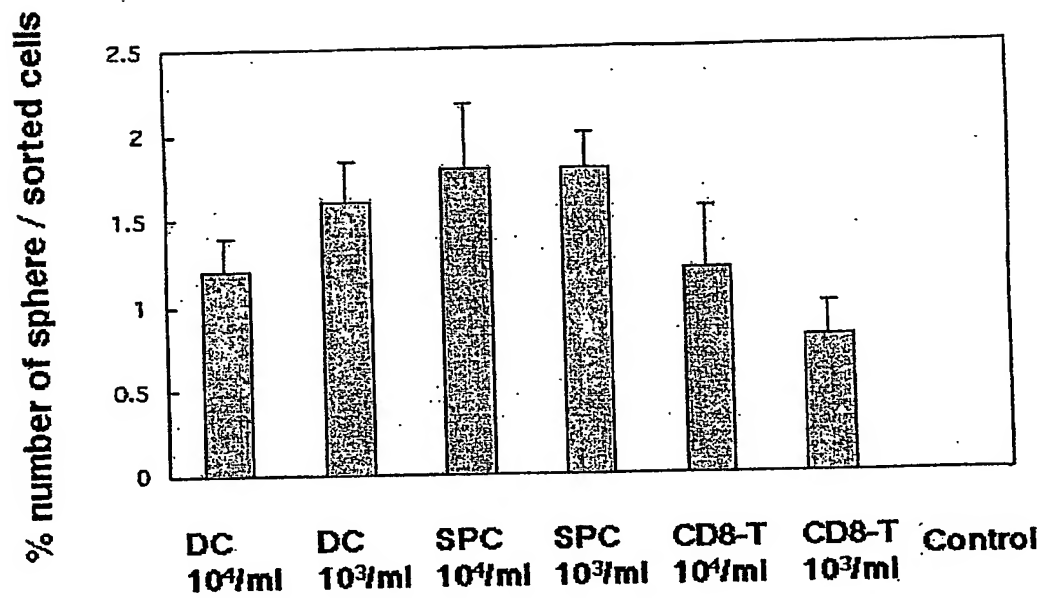
【図 6】



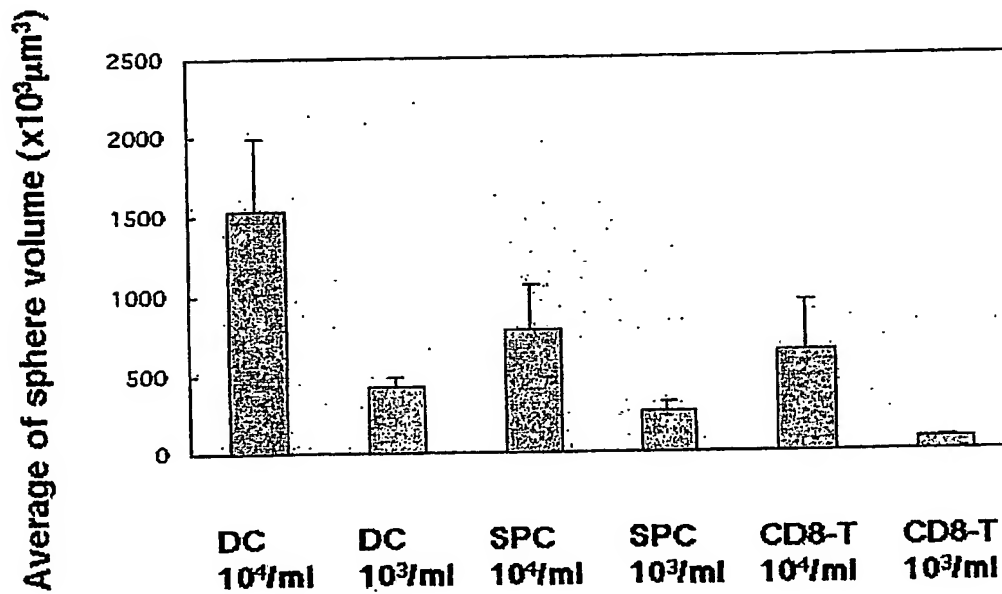
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 神経損傷又は神経機能不全疾患の移植治療等に最も重要である神経幹細胞をインビトロ、インビボで効率良く増殖誘導する方法を提供すること。

【解決手段】 神経幹細胞を含む哺乳類神経組織を分離し、EGFやFGF等の成長因子を含む培養培地中で神経幹細胞を選択的に培養し、次いで神経幹細胞と、細胞表面にCD11cの表面マーカーを有する未成熟樹状細胞サブセット等の樹状細胞や、脾細胞、CD8陽性T細胞等の血球系細胞とを共培養するか、培養後の神経幹細胞をGM-CSFの存在下に培養するか、又は、培養後の神経幹細胞を樹状細胞の培養上清や血球系細胞の培養上清中で神経幹細胞を培養する。

認定・付加情報

| | |
|---------|---------------|
| 特許出願の番号 | 特願2002-089624 |
| 受付番号 | 50200437182 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 笹川 友子 9482 |
| 作成日 | 平成14年 3月29日 |

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

| | |
|----------|------------------|
| 【識別番号】 | 899000079 |
| 【住所又は居所】 | 東京都港区三田2丁目15番45号 |
| 【氏名又は名称】 | 学校法人 慶應義塾 |

【代理人】

| | |
|----------|----------------------------------|
| 申請人 | |
| 【識別番号】 | 100107984 |
| 【住所又は居所】 | 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 廣田 雅紀 |

【選任した代理人】

| | |
|----------|----------------------------------|
| 【識別番号】 | 100102255 |
| 【住所又は居所】 | 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 小澤 誠次 |

【選任した代理人】

| | |
|----------|----------------------------------|
| 【識別番号】 | 100118957 |
| 【住所又は居所】 | 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 岡 晴子 |

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[899000079]

| | |
|----------|------------------|
| 1. 変更年月日 | 1999年 9月17日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 東京都港区三田2丁目15番45号 |
| 氏 名 | 学校法人慶應義塾 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.